

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09106

研究課題名(和文) 微小環境を基盤とした中枢神経系原発悪性リンパ腫の本態解明と新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Elucidating the nature of primary central nervous system lymphoma based on the microenvironment and exploring new therapeutic targets

研究代表者

西 真由子(Nishi, Mayuko)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：90635343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経原発リンパ腫(PCNSL)は、臨床上きわめて重症な脳外科領域悪性腫瘍であるにもかかわらず、その発生母地や増殖浸潤における詳細な分子メカニズムについては未だ解明されていない。これは、PCNSLの生体外培養系が確立されていないことに起因する。我々はコラーゲン膜をインサートに使用したad-MEDビトリゲルを活用し、患者から採取されたPCNSL細胞と脳血管周皮細胞であるペリサイトを両面培養することで、PCNSLの生存に必要な最小限の微小環境を維持する生体外培養系の構築に成功した。この共培養システムを用いてPCNSLの増殖・進展に重要なシグナルパスウェイおよびリン酸化シグナル因子を複数特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来PCNSL研究は、患者腫瘍組織を免疫不全マウス脳内に移植した”Orthotopic(同所性)”PDX(patient-derived xenograft)が、生体外で腫瘍細胞を増殖できる唯一の方法として活用されてきた。しかしながら、PDXは腫瘍細胞以外の細胞群がマウス由来細胞であること、生きたマウス脳内に細胞を移植するための労力や費用が負担になること、一細胞レベルの解析やハイスループットの薬剤スクリーニングには適さないことなどがネックになっていた。我々が構築したPCNSL-ペリサイト両面培養系により諸問題が解決され、PCNSLの新規治療法開発に向けた基盤研究が促進されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Primary central nervous lymphoma (PCNSL) is a malignant lymphoma that is confined to the central nervous system and does not involve other organs, with rapid progression and a poor long-term prognosis. Although PCNSL is a clinically serious malignant tumor, the detailed molecular mechanisms of its origin and proliferation/invasion have not yet been elucidated. This is due to the fact that PCNSL requires a specific microenvironment for growth, which has not been achieved in in vitro culture systems. We have successfully established an in vitro culture system that maintains the minimum microenvironment required for PCNSL survival by using ad-MED vitrigel with a collagen vitrigel membrane as an insert, to double-side-culture PCNSL cells from patients and cerebrovascular-derived pericytes. Using this co-culture system, we identified several signaling pathways and subsequent phosphorylation signaling factors that are important for the proliferation and progression of PCNSL.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍 悪性リンパ腫 微小環境 細胞間相互作用 ペリサイト

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系原発悪性リンパ腫 (primary central nervous system lymphoma; PCNSL) は、臨床
上きわめて重症な脳外科領域悪性腫瘍であり、近年増加傾向にある。約 90%の PCNSL はびま
ん性大細胞型 B 細胞リンパ腫であり、血管周囲腔に沿って脳実質内に広範囲に渡って浸潤する。
再発率が高く、5 年生存率は 30%~50%と全身性悪性リンパ腫と比較しても予後不良である。
このことから、新たな治療法の開発が急務となっている。しかしながら、PCNSL の起源や発
生母地、増殖浸潤における詳細な分子メカニズムについては未だ解明されていない。これは、
PCNSL の性質を解明するために必要な生体外培養系が実現していないことに起因する。我々は
これまでに組織再構築に有用なコラーゲンビトリゲル膜をインサートに使用した ad-MED ビト
リゲルを活用し、患者の腫瘍組織から採取された PCNSL 細胞と脳血管由来血管周皮細胞 (Brain
Vascular Pericytes、以下、ペリサイト) を両面培養することで、PCNSL の生存に必要最小限
の微小環境を維持する生体外培養系の構築に成功した。本研究では、上記の *ex vivo* モデルを用
いて PCNSL の生存や増殖に必須な細胞内シグナルや関連因子を同定し新たな治療標的の探索
を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、ad-MED ビトリゲルを用いて脳血管由来ペリサイトとの共培養により樹立した患
者由来 PCNSL 細胞株を用いて、PCNSL とペリサイトの両側面から PCNSL 増殖・進展の分子
メカニズムや責任因子を特定することで、微小環境や細胞間相互作用を基軸とした PCNSL の
本態解明およびそれを活用した新たな PCNSL 治療戦略の提案を目的とする。さらには、本シス
テムをハイスループットの薬剤スクリーニング系などに応用し、新規治療剤候補物質を探索す
る。

3. 研究の方法

1) PCNSL 生体外培養系の確立

はじめに、患者由来 PCNSL を用いて生体外培養系の条件検討を行った。コラーゲンビトリゲル膜
をインサートに使用し、PCNSL をペリサイトと両面培養、ペリサイト培養上清添加培養、ペリサ
イトを底面培養した共培養について検討した。次に、コントロールとして、アストロサイト、血
管内皮細胞、線維芽細胞を用いた両面培養を行い比較した。ペリサイトと PCNSL 細胞の播種割合
について、細胞密度を数点振って培養し、最適密度を決定した。培養培地は、スクリーニングに
用いることから汎用性の高い RPMI を基礎培地とし、血清や成長因子のうち増殖に必要最低限の
添加物について検討した。

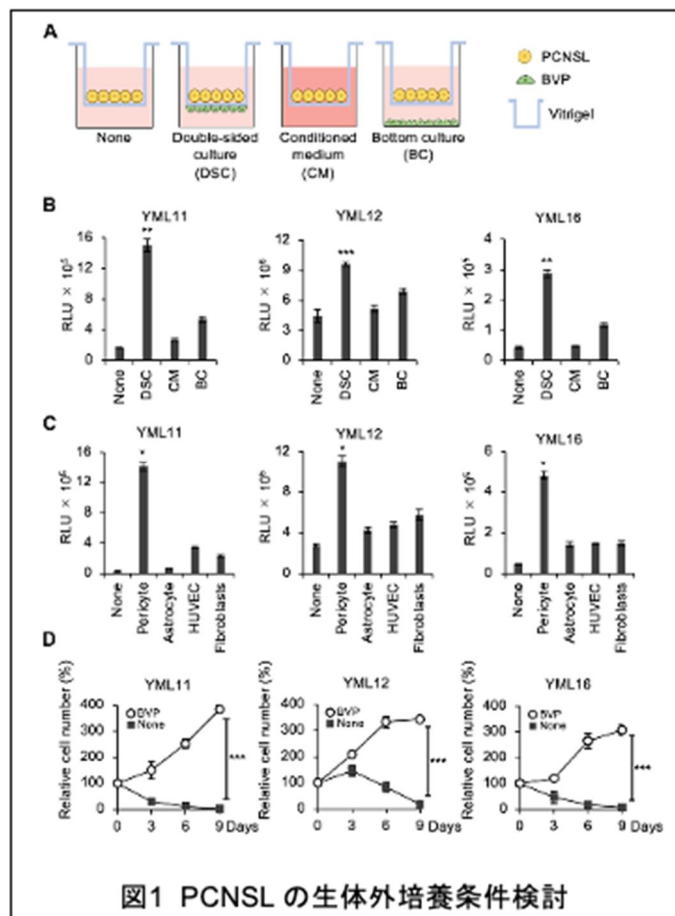
2) PCNSL 増殖に関与する責任因子の探索

ペリサイトとの両面培養により活性化する細胞内シグナルを特定するため、ペリサイトとの両

面培養有無の条件で培養した PCNSL 細胞ライセートについてリン酸化プロテオミクス解析および IPA (Ingenuity Pathway Analysis) によるパスウェイ解析を行った。次に Cytokine-cytokine receptor interaction アレイを用いて、ペリサイト-PCNSL の相互作用に関与するリガンド-受容体の組み合わせとその細胞内シグナル経路を探索した。さらに、リン酸化特異的プロリン異性化酵素である Pin1 と相互作用する転写因子群を同定し、PCNSL 増殖における役割について考察した。

4. 研究成果

PCNSL の本態解明を行うには、患者由来 PCNSL 細胞を生体外で安定的に増殖させる必要がある。まず、PCNSL が脳血管に沿って進展する病理組織を手がかりに、PCNSL が増殖する環境には血管周囲を構成する微小環境が必須であると考えた。そこで、血管周囲を取り巻く脳血管周皮細胞(ペリサイト)から分泌された物質が、近接する PCNSL 細胞に作用し、増殖・進展が促されるという仮説を立て、その責任因子の特定を試みた。はじめに、細胞間相互作用の解析ツールとして ad-MED コラーゲンビトリゲル膜を使用し、生体内の環境を模した近接両面培養系を実現した。様々な培地や添加物、細胞播種数や密度等の検討を行ない、



PCNSL 細胞を生体外で増殖できる培養系を構築した。本培養系を用いて増やした PCNSL をマウス脳に移植して得られた PCNSL 細胞株は、それぞれ患者脳組織で見られたものと同様の増殖・進展様式を示す悪性形質が認められた。予備実験として、I 型コラーゲンやマトリゲルでコートした Transwell を用いた培養を試みたが、ad-MED ビトリゲルが最も良く PCNSL の増殖を亢進した。また、ペリサイトをプレート底面で培養した上に ad-MED ビトリゲルを設置し PCNSL 培養を行ったが、劇的な増殖亢進には至らなかった。さらに、アストロサイトや血管内皮細胞、線維芽細胞などの両面培養や、ペリサイト培養上清を添加した培養を行なったが、いずれも PCNSL の長期培養には適さなかったことから、責任因子はペリサイト近傍で働くか、半減期の短い因子であることが予想された (図1)。

続いて、ペリサイトとの両面培養により活性化する因子を特定するため、リン酸化プロテオミクス解析を行った。Phos-tag アガロースビーズを用いて、ペリサイトとの共培養有無それぞれのPCNSL細胞ライセート中におけるリン酸化ペプチドを濃縮し、LC-MS/MSにより解析した。その結果、ペリサイトとの共培養により顕著に上方制御さ

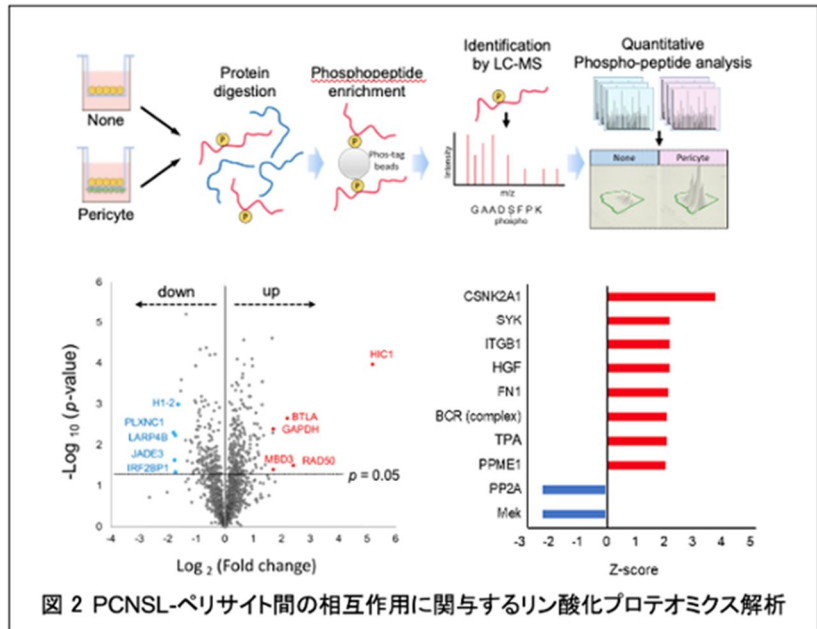


図 2 PCNSL-ペリサイト間の相互作用に関与するリン酸化プロテオミクス解析

れるタンパク 28 個、下方制御されるタンパク 20 個を同定した。さらに、得られたデータについて IPA を用いたパスウェイ解析を行ったところ、肝細胞増殖因子 HGF や B 細胞受容体 BCR を含むシグナル経路が関与していることがわかった (図 2)。

加えて、Cytokine-cytokine receptor interaction アレイを用いたリガンド-受容体パターンをスクリーニングしたところ、ペリサイトから分泌される HGF が PCNSL 細胞膜上の c-MET を介して相互作用すること

が示唆された (図 3 A,B)。実際に、ペリサイト非存在下の PCNSL 単独培養においてリコンビナント HGF を加えると PCNSL の増殖が認められた (図 3 C)。しかしながら、その効果はペリサイト培養時と比較すると低く、またペリサイト共培養時の c-MET 阻害剤による増殖阻害効果が部

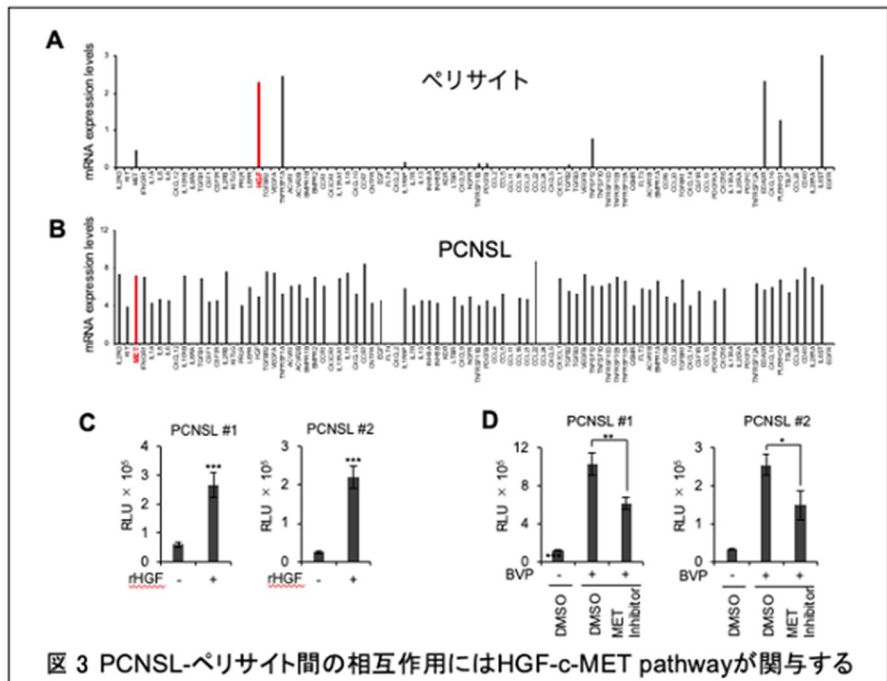
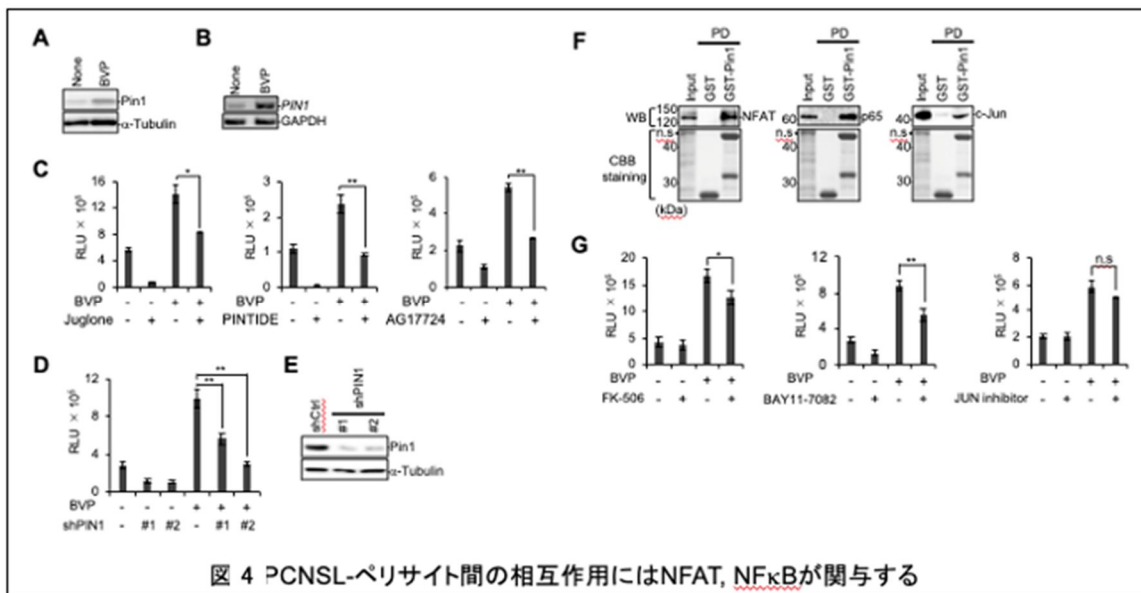


図 3 PCNSL-ペリサイト間の相互作用にはHGF-c-MET pathwayが関与する

分的であることから (図 3 D) HGF-c-MET パスウェイ以外の、別の細胞内リン酸化シグナルの関与が示唆された。

これらのシグナルを特定するため、まずリン酸化タンパク質の機能調節に重要な因子である PIN1 の関与について調べた。ペリサイトと共培養有無で比較すると、共培養時の PCNSL 細胞では Pin1 の mRNA およびタンパク発現が上昇していた (図 4 A,B)。また、Pin1 特異的阻害剤を両面培養系に添加したところ、PCNSL の増殖が顕著に抑制された (図 4 C)。また Pin1 遺伝子をノックダウンした PCNSL 細胞では、両面培養においてもその増殖が顕著に抑制されることがわかった (図 4 D,E)。Pin1 は 転写因子 と相互作用することでリン酸化シグナル伝達において中心的な役割を果たすことが知られている。そこで、B 細胞リンパ腫で重要な転写因子として報告されている NFAT、NF- κ B p65、c-Jun、および BCL6 について GST-Pin1 プルダウンアッセイを実施したところ、BCL6 以外の転写因子と Pin1 との結合が見られた (図 3 F)。それぞれの特異的阻害剤を PCNSL 細胞に処理したところ、ペリサイトとの両面培養下においても PCNSL の増殖が抑制された (図 4 G)。これらの結果から、HGF-c-Met が関与するシグナル経路に加えて、Pin1 が制御する NFAT および NF- κ B を介したシグナルが PCNSL 細胞の生存と増殖に影響を与える可能性があることが示唆された。本成果は *Frontiers in Cell and Developmental Biology* にまとめた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mayuko Nishi, Kensuke Tateishi, Jeremiah Stanleyraj Sundararaj, Yoko Ino, Yusuke Nakai, Yasuyoshi Hatayama, Yutaro Yamaoka, Yusaku Mihana, Kei Miyakawa, Hirokazu Kimura, Yayoi Kimura, Tetsuya Yamamoto, Akihide Ryo	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a contacting transwell co-culture system for the in vitro propagation of primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1275519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2023.1275519.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西 真由子, 立石健祐, 中居佑介, 巳鼻佑作, 木村弥生, 山本哲哉, 梁 明秀
2. 発表標題 血管周皮細胞と共培養された原発性CNSリンパ腫（PCNSL）の細胞生存と増殖におけるプロリルイソメラーゼPin1の役割
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------